

วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 (2555)

ผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณบิโแทนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp.

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์¹ กนกกานต์ นาคทอง¹ ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ¹ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ^{2,3*}

¹ภาควิชาชีววิทยา ²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป และ ³หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

*E-mail: surasaki@swu.ac.th

รับบทความ: 10 เมษายน 2555 ยอมรับตีพิมพ์: 18 พฤษภาคม 2555

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยง BG₁₁ ภายใต้ภาวะความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญของ *Spirulina* sp. เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ซึ่งเจริญได้ดีใกล้เคียงกับภาวะปกติที่ไม่เติมเกลือ ส่วน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0 M NaCl) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้อัตราการเจริญของ *Anabaena* sp. ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะที่เหมาะสม เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ในขณะที่ *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. เท่ากับ 0.5 โมลาร์ จากนั้นติดตามปริมาณบิโแทนของ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ พบว่า ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ให้ปริมาณบิโแทนสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ดังนั้นอธิบายได้ว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการสะสมบิโแทนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์

คำสำคัญ: ไซยาโนแบคทีเรีย บิโแทน ความเครียดจากเกลือ

Effect of Salinity on Growth and Betaine Content of Filamentous Cyanobacteria *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp.

Potitorn Kanchitanurak¹, Kanokgarn Naktong¹, Chaiyasad Kachensuwan¹ and Surasak Laloknam^{2,3*}

¹ Department of Biology, ² Department of General Science and ³ Research Unit on Science Technology and Environment for Learning, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand

*E-mail: kiatiasak@swu.ac.th

Abstract

The growth of cyanobacterium *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. was stimulated by increasing of salinity range of 0 – 1 M NaCl in BG₁₁ medium. The optimal growth rate of *Spirulina* sp. under salinity was 0.25 M NaCl nearest with 0 M NaCl, and the optimal growth rate of *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. were condition without NaCl (0 M NaCl), The salt stress condition is growth rate half of optimal growth rate of *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. as 0.25, 0.5 and 0.5 M NaCl, respectively. The betaine content in all cyanobacteria was determined under normal and salt stress conditions. At the salt stress condition, all cyanobacteria showed betaine content higher than normal condition about 2 folds. These results suggested that all cyanobacteria *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. were accumulated betaine under salt stress condition.

Keywords: Cyanobacteria, Betaine, Salt stress

บทนำ:

ความเค็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากกระบวนการทำงานของเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงมีความจำเป็นที่ต้องปรับตัวโดยควบคุมปริมาณไอออน และรักษาความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในภาวะสมดุลเพื่อให้กิจกรรมของเซลล์ดำเนินเป็นปกติ (Kapper et al, 1996; Padan and Schuldiner, 1996; Waditee et al., 2002, 2005)

สิ่งมีชีวิตบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียมีกลไกรักษาสมดุลของเซลล์โดยการสะสมสารคอมแพทิเบิลโซลูท (compatible solute) หรือสารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ช่วยรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้คงที่ เช่น โพรลีน (proline) โคลีน (choline) และไกลซีน-บีเทน (glycine betaine) (Bohnert and Jenzen, 1996; Laloknam et al., 2006; Mackey et al., 1984; Zhu et al., 1997)

การสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสิ่งมีชีวิตทำได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์สารขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมี-

ชีวิตเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียด สารที่สะสมนั้นจะเป็นกรดอะมิโน และอนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น การสะสมไกลซีนบีเทนใน *Aphanathece halophytica* ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โดยเปลี่ยนไกลซีนเป็น ซาร์โคซีน (sarcosine) ไดเมทิลไกลซีน (dimethyl glycine) และไกลซีนบีเทน ตามลำดับ โดยอาศัยเอนไซม์ glycine sarcosine methyl transferase และ dimethyl transferase (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ, 2554) นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าสารออสโมโพรเทคแทนต์โดยโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ใน *Escherichia coli* มีระบบการขนส่งสารได้แก่ ProP ProU และ BetT โดยขึ้นอยู่กับความจำเพาะในการขนส่งสารแต่ละชนิด (Kemp and Bremer, 1998)

กรดอะมิโนเป็นสารชีวโมเลกุลที่แสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการรักษาสมดุลของเซลล์ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ *B. subtilis* มีการสะสมกรดอะมิโน โพรลีน (proline) และกลูตาเมต (glutamate) (Kemp and Bremer, 1998)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณบีโตนในไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มทดสอบผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ ภายใต้ภาวะที่มีแสงสีขาว ($30 \mu\text{Em}^2 \text{s}^{-1}$) ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อหาภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียดีที่สุด และภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียลดลงครั้งหนึ่งของภาวะปกติ (ภาวะเครียด)

ทดสอบบีโตนของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

เพาะเลี้ยง *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ ที่ไม่มีเกลือ NaCl (ภาวะปกติ) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl (*Anabaena* sp. ใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.25 โมลาร์ ส่วน *Spirulina* sp. และ *Nostoc* sp. ใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.5 โมลาร์) ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 วัน เพื่อติดตามปริมาณบีโตนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จากนั้นวัดปริมาณบีโตนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Grieve and Grattan (1983) โดยการนำไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่างหนัก 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร ตามด้วย 2N H₂SO₄ 250 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 5 ไมโครลิตร แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้เติมด้วยไดคลอโรมีเทน 1 มิลลิลิตร และวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm) หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานบีโตน

ผลการวิจัยและอภิปราย

ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG₁₁ ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1 โมลาร์ แล้วทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl (ภาพที่ 1 - 3)

จากภาพที่ 1 – 3 แสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวิคูณ (mid-log phase) อยู่ระหว่างวันที่ 12 – 18 วัน และ ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตาราง 1 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จะลดลง และเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 โมลาร์ขึ้นไป *Spirulina* sp. และ *Nostoc* sp. ไม่สามารถเจริญได้ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ขึ้นไป *Anabaena* sp. ไม่สามารถเจริญได้ (ตาราง 1)

บงกช บุญบุรพวงษ์ และคณะ (2554) รายงานว่า *Synechococcus* sp. PCC7942 เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด ภาวะปกติของการเจริญ คือ ไม่มีเกลือ NaCl และภาวะเครียดจากเกลือ NaCl คือ 0.25 โมลาร์ และทนความเค็มได้น้อยกว่า 0.5 โมลาร์ ในขณะที่ *Synechocystis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ทนเค็มได้สูงถึง 1.5 โมลาร์ และ 3.0 โมลาร์ ตามลำดับ

การติดตามปริมาณบีโตนของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

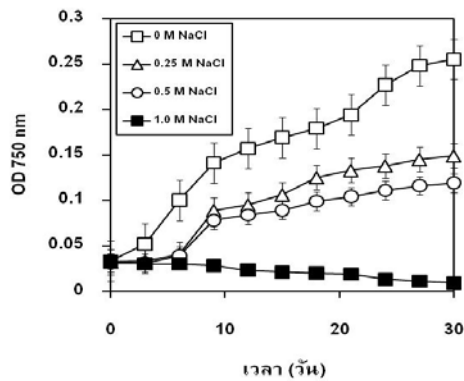
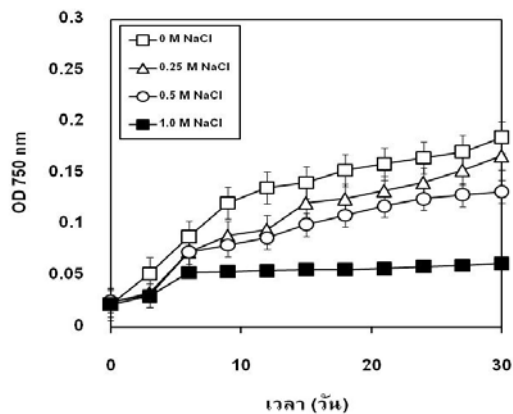
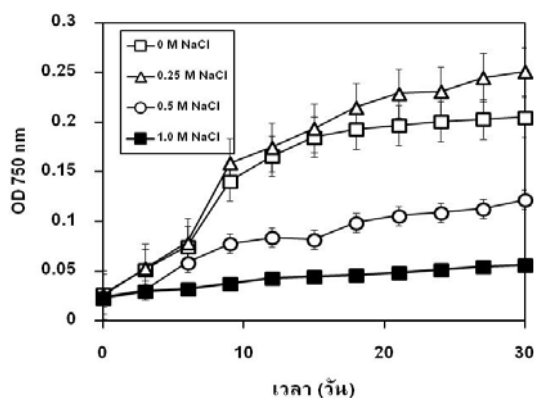
เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG₁₁ ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl และติดตามปริมาณบีโตนทุก 6 วัน ตามวิธีการทดลอง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 4 – 6

ตาราง 1 แสดงภาวะต่างๆ ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl* (โมลาร์)		
	ภาวะที่เหมาะสม	ภาวะที่มีความเครียด**	ความสามารถในการทนเค็ม
<i>Anabaena</i> sp.	0	0.25	<0.25
<i>Nostoc</i> sp.	0	0.5	<0.5
<i>Spirulina</i> sp.	0.25	0.5	<0.5

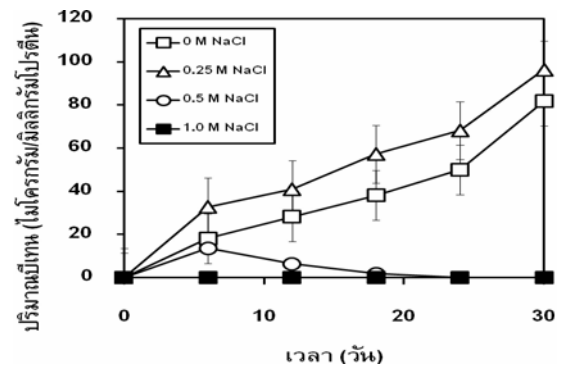
*ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ใช้ในการศึกษา 0 – 1 โมลาร์

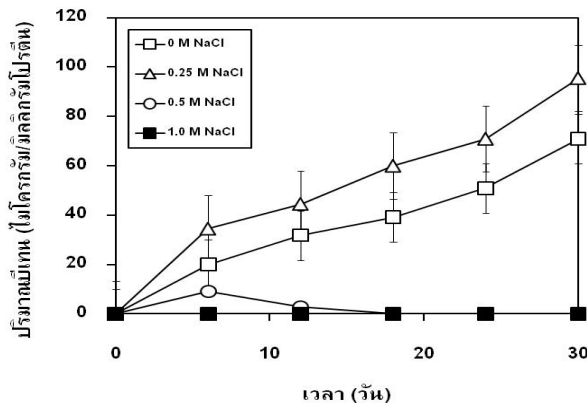
**ความเครียด คือ ภาวะที่ความเจริญลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะที่เหมาะสม

ภาพที่ 1 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Anabaena* sp.ภาพที่ 2 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Nostoc* sp.ภาพที่ 3 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Spirulina* sp.

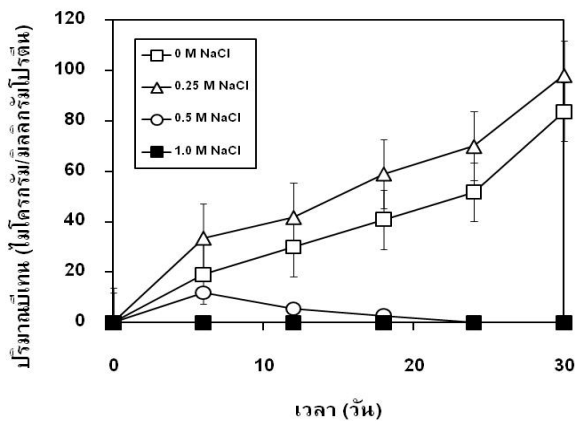
จากภาพที่ 4 – 6 พบว่า ปริมาณบีโตนของ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ในวันที่ 6 12 18 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณบีโตนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณบีโตนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณบีโตนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบปริมาณบีโตนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (ภาพที่ 7) พบว่า *Nostoc* sp. ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Spirulina* sp. และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ

มีรายงานการเติมกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ กลูตาเมต โพรลีน และ ไกลซีน ต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. PCC7942 *Synechocystis* sp. PCC6803 และ *Aphanethece halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ พบว่า กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของ *A. halophytica* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือได้ (บงกชบุญบุรพวงษ์ และคณะ, 2554)

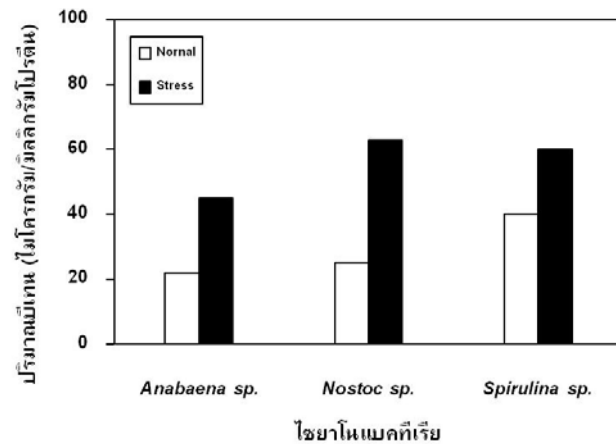
ภาพที่ 4 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีโตนของ *Anabaena* sp.



ภาพที่ 5 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีโตนของ *Nostoc* sp.



ภาพที่ 6 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีโตนของ *Spirulina* sp.



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณบีโตนของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือในวันที่ 18

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้สรุปได้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. มีความสามารถในการทนความเค็มได้ต่างกัน โดย *Anabaena* sp. มีความสามารถในการทนความเค็มน้อยที่สุด (≤ 0.25 โมลาร์ NaCl) ในขณะที่ *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. มี

ความสามารถในการทนเค็มเท่ากันที่ 0.5 โมลาร์ NaCl และ ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Spirulina* sp. *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. มีการสะสม บีโตนสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ชนิดบีโตน ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ

เอกสารอ้างอิง

บงกช บุญบุรุษ อารณ บัวหลวง อรัญ อินเจริญศักดิ์ ยุวธิดา นิลผาย ปนัดดา พงษ์ขวัญ อภิญญาณ บุญประกอบกุล และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). ผลของไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ 2(1): 48–58.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). การปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรีย ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ 2(1): 82 – 88.

Bohnert, H. J., and Jenzen, R.G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends Biotechnol.** 14: 89-97.

Grieve, C. M., and Grattan, S. R. (1983). Rapid assay for determination of water-soluble quaternary-aminocompounds. **Plant Soil.** 70: 303–307.

Kapper, R. M., Kempf, B., and Bremer, F. (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. **J. Bacteriol.** 178: 5071–5079.

Kemp, B., and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high – osmolality environments. **Arch. Microbiol.** 170: 319–330.

Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2006). Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a Betaine

- transporter active at alkaline pH and high salinity. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(9): 6018–6026.
- Mackey, M. A., Norton, R. S., and Borowitzka, L. J. (1984). Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.** 130: 2177–2191.
- Padan, E., and Schuldiner, S. (1996). Bacterial Na⁺/H⁺ antiporters: molecular biology, biochemistry, and physiology. In **Handbook of Biological Physics**, Konings, W. N., Kaback, H. R. and Lolkema, J. (eds.). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science.
- Waditee, R., Bhuiyan, M. N. H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A. T., Takabe, T., and Takabe, T. (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 1318–1323.
- Waditee, R., Hibino, T., Nakamura, T., Incharoensakdi, A., and Takabe, T. (2002). Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 4109–4114.
- Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plant. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16: 253–277.